

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Métodos fotométricos em cuvete para determinação de azoto e  
fósforo total nos efluentes da Caima - Validação e Controlo de  
Qualidade.**

Sílvia Alexandra dos Santos Cardoso

**Mestrado em Química Tecnológica**

Versão Pública

Dissertação orientada por:  
Professora Doutora Maria da Soledade C. S. Santos



## Resumo

Esta dissertação teve como objetivos a validação de dois métodos internos de ensaio, para determinação de azoto e fósforo total, respetivamente, e a definição dos planos de Controlo de Qualidade Internos necessários.

Os processos de validação realizados incluíram o ajuste das gamas de trabalho, a verificação da linearidade das retas de calibração, o estudo da seletividade dos métodos analíticos, a verificação das calibrações realizadas e, por fim, a análise da precisão, justeza e robustez dos métodos de ensaio.

Durante o processo de validação foram detetadas algumas falhas nos métodos, bem como a existência de potenciais substâncias interferentes que, acima de um determinado nível de concentração, podiam comprometer a seletividade dos métodos e, consequentemente, a obtenção de resultados exatos. Todos os problemas detetados foram devidamente ultrapassados, aplicando e respeitando alguns critérios definidos durante o trabalho.

É de salientar que todos os resultados obtidos nas fases iniciais das validações – gama de trabalho, reta de calibração, seletividade e verificação da calibração – respeitam os critérios de aceitação estipulados pelo *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (SMEWW), pelo Guia da Relacre e pelo laboratório da Caima.

De acordo com os testes estatísticos realizados, concluiu-se que os métodos são suficientemente precisos para poder substituir os métodos atualmente acreditados no laboratório. No que diz respeito à justeza, para que se possa concluir se os métodos em estudo têm uma justeza igual ou superior à dos métodos de referência, é necessário que seja realizada primeiramente a manutenção externa do equipamento utilizado pelos métodos atualmente acreditados no laboratório. Contudo, é de salientar que nos testes de comparação com os MRCs, os métodos apresentaram uma justeza satisfatória.

Por fim, foi também delineado um plano de controlo de qualidade interno igual para cada um dos métodos em estudo, baseado nas sugestões do SMEWW.

\*máximo 300 palavras\*

Palavras-chave: Azoto total; Fósforo total; Validação de métodos internos.



## Abstract

This dissertation aims the validation of two internal test methods, for the determination of total nitrogen and total phosphorus, respectively, and the definition of the necessary Internal Quality Control plans.

The validation processes performed included adjusting the working range, verifying calibration linearity, studying the analytical methods selectivity, verifying the calibration performed and, finally, analysing the precision, trueness and robustness of the test methods.

During the validation process some flaws in the methods performance were detected, as well as the presence of potential interfering substances that, above a certain concentration level, could alter the selectivity of the methods and, consequently, the ability to obtain accurate results. However, all detected problems were overcome, due through the development of specific criteria defined throughout the work.

It should be noted that all results obtained in the early stages of validation - working range, calibration line, selectivity and calibration verification - comply with the acceptance criteria stipulated by the Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (SMEWW), Relacre and by Caima's lab.

According to the statistical tests performed, it was concluded that the methods have adequate precision to be able to replace the methods currently accredited in the laboratory. Regarding the trueness, in order to conclude if the methods under study are equal or superior to the reference methods, a preliminary external maintenance of the equipments, used by the methods currently accredited in the laboratory, is necessary. However, it should be noted that, upon comparison to CRMs, the methods presented a satisfactory trueness.

Finally, an equal internal quality control plan for each of the methods under study, based on SMEWW suggestions, was also outlined.

Key-words: Total nitrogen; Total phosphorus; Internal methods validation.



# Índice

Agradecimentos.....	
Resumo.....	
Abstract .....	
Índice.....	
Índice de figuras .....	
Índice de tabelas .....	
1. Introdução.....	
1.1 A empresa.....	
1.2 A fábrica: da madeira à pasta .....	
1.3 A ETAR.....	
1.4 O laboratório .....	
2. Contextualização do tema .....	
2.1 O problema.....	
2.2 A solução.....	
3. Material .....	
3.1 Método A.....	
3.2 Método B.....	
3.3 HT 200S .....	
3.4 DR 3900 .....	
3.5 Micropipetas.....	
4. Parte experimental.....	
4.1 Amostragem .....	
4.2 Pré-tratamento .....	
4.3 Procedimento.....	
4.3.1 Método A.....	
4.3.2 Método B .....	
4.3.3 Tempo de repouso: um ponto crítico de ambos os procedimentos.....	

5.	Validação do método de ensaio.....	
5.1	Gama de trabalho.....	
5.2	Curva de calibração.....	
5.2.1	Linearidade.....	
5.2.2	Limites analíticos .....	
5.2.3	Sensibilidade .....	
5.3	Seletividade .....	
5.4	Verificação da calibração .....	
5.5	Avaliação da exatidão – Métodos estatísticos .....	
5.5.1	Precisão .....	
A.	Repetibilidade.....	
B.	Precisão Intermédia .....	
C.	Comparação da precisão entre métodos.....	
5.5.2	Justeza .....	
A.	Materiais de Referência Certificados .....	
i)	Erro relativo .....	
ii)	Teste de hipóteses (teste t) .....	
iii)	Fator de desempenho Z (Z-score).....	
iv)	Erro normalizado .....	
B.	Testes comparativos.....	
i)	Teste t das médias .....	
ii)	Teste t das diferenças (amostras emparelhadas) .....	
C.	Ensaio interlaboratoriais.....	
5.6	Robustez.....	
6.	Plano de Controlo de Qualidade Interno .....	
7.	Rentabilidade dos métodos em estudo .....	
8.	Ambiente e Segurança.....	
9.	Conclusão.....	
	Bibliografia.....	



Anexos.....	
A. Cálculos prévios .....	
B. Cálculo das incertezas .....	
C. Estudo da seletividade .....	
1. Determinação de carbonatos .....	
2. Determinação de cloretos .....	
3. Determinação de CQO .....	
4. Determinação de sílicas .....	
5. Determinação de sulfatos .....	
6. Determinação de metais (via ICP).....	



## Índice de figuras

- Figura 1 - Organograma do grupo Altri.
- Figura 2 - Distribuição das áreas de atuação da Altri Florestal por distrito.
- Figura 3 - 17 Objetivos propostos pelas Nações Unidas para um desenvolvimento sustentável do planeta.
- Figura 4 - Esquema do processo de fabrico.
- Figura 5 - Processo de tratamento de efluentes.
- Figura 6 - Instalações do laboratório.
- Figura 7 - Efeitos da eutrofização.
- Figura 8 - Esquema processual do Skalar para a análise de azoto total.
- Figura 9 - Esquema processual do Skalar para a análise de fósforo total.
- Figura 10 – Método A.
- Figura 11 - Método B.
- Figura 12 - Termostato HT200S
- Figura 13 - Espetofotómetro DR3900.
- Figura 14 - Frascos de recolha de amostras.
- Figura 15 - Carta de controlo: estabilidade da amostra relativamente à presença de azoto total.
- Figura 16 - Carta de controlo: estabilidade da amostra relativamente à presença de fósforo total.
- Figura 17- Montagem relativa à filtração das amostras.
- Figura 18 - Esquematização do procedimento experimental do Método A.
- Figura 19 - Esquematização do procedimento experimental do Método B.
- Figura 20 - Comparação dos volumes inicialmente colocados nas cuvets de teste pelo fabricante.
- Figura 21 - Comparação visual de volumes de solução após a digestão a 100°C.
- Figura 22 - 23ª Edição do livro SMEWW.
- Figura 23 - Representação gráfica do ponto centróide.
- Figura 24 - Reta de calibração do 1º replicado relativa à determinação da concentração de azoto total.
- Figura 25 - Reta de calibração do 1º replicado relativa à determinação da concentração de fósforo total.
- Figura 26 - Reta de calibração do 1º replicado relativa à determinação da concentração de fósforo total.
- Figura 27 - Avaliação da precisão intermédia do método de determinação de Nt, no 2º dia de análise.



## Índice de tabelas

Tabela 1 - Reagentes utilizados no Método A.

Tabela 2 - Reagentes utilizados no Método B.

Tabela 3 - Teste de Grubbs aplicado no ajuste das gamas de trabalho do Método A (verde) e Método B (laranja).

Tabela 4 - Teste de homogeneidade de variâncias.

Tabela 5 - Concentrações dos padrões de calibração.

Tabela 6 - Valores de absorvância obtidos em cada padrão de calibração analisado nos métodos de azoto total (a verde) e de fósforo total (a laranja).

Tabela 7 - Coeficientes de correlação das funções de calibração lineares e quadráticas para o método de determinação de azoto total (a verde) e de fósforo total (a laranja).

Tabela 8 - Resultados do Teste de Mandel para os métodos de determinação de Nt (a verde) e de Pt (a laranja).

Tabela 9 - Coeficientes de correlação e desvios-padrão residuais para cada replicado, nos métodos de determinação de azoto total (a verde) e de fósforo total (a laranja).

Tabela 10 – Limites de quantificação obtidos nos métodos de determinação de Nt (a verde) e de Pt (a laranja).

Tabela 11- Valores de repetibilidade do método de Nt (a verde) e de Pt (a laranja).

Tabela 12 - Avaliação da condição de repetibilidade para o método de determinação de Nt.

Tabela 13 - Avaliação da condição de repetibilidade para o método de determinação de Pt.

Tabela 14 - Valores de precisão intermédia do método de Nt.

Tabela 15 - Valores de precisão intermédia do método de Pt.

Tabela 16 - Desvio-padrão da precisão intermédia para o método de determinação de Nt (a verde) e de Pt (a laranja).

Tabela 17 – Avaliação da precisão dos métodos de Nt (a verde) e de Pt (a laranja), por comparação com os respetivos métodos de referência.

Tabela 18 - Valores de concentração de azoto total (a verde) e de fósforo total (a laranja) obtidos na análise de um padrão VKI QC WW3.

Tabela 19 - Parâmetros de análise relevantes no cálculo do Erro Relativo, para o método de determinação de Nt (a verde) e de Pt (a laranja).

Tabela 20 - Parâmetros de análise do teste de hipóteses, para o método de determinação de Nt (a verde) e de Pt (a laranja).

Tabela 21 - Parâmetros de análise relevantes no cálculo do Z-score, para o método de determinação de Nt (a verde) e de Pt (a laranja).

Tabela 22 – Valores de incerteza do laboratório para o método de determinação de Nt (a verde) e de Pt (a laranja).

Tabela 23 - Intervalo de concentrações de Nt (a verde) e de Pt (a laranja) abrangidos pela incerteza de resultados.

Tabela 24 - Valores de Erro Normalizado para o método de determinação de Nt (a verde) e de Pt (a laranja).

Tabela 25 - Dados relativos a análise de uma amostra de efluente para determinação de Nt (a verde) e de Pt (a laranja), via método em estudo e método de referência.

Tabela 26- Dados relativos a análise de um padrão para determinação de Nt (a verde) e de Pt (a laranja), via método em estudo e método de referência.

Tabela 27 - Valores de Fexp calculados para os replicados obtidos no método de determinação de Nt (a verde) e de Pt (a laranja).

Tabela 28 - Valores de texp calculados para os replicados obtidos no método de determinação de Nt (a verde) e de Pt (a laranja).

Tabela 29- Valores de texp e ttab calculados para os replicados obtidos a partir de uma amostra de efluente e de um padrão, no método de determinação de Nt (a verde) e de Pt (a laranja).

Tabela 30 - Gamas de trabalho dos métodos em estudo e dos métodos de referência, para o Nt (a verde) e Pt (a laranja).

Tabela 31 - Valores médios de concentração obtidos segundo os métodos em estudo e os métodos de referência do Nt (a verde) e do Pt (a laranja).

Tabela 32 - Valores de absorvância observados na variação dos fatores em estudo no método de determinação de Nt (a verde) e de Pt (a laranja).

Tabela 33 - Coeficientes de variação registrados no estudo da estabilidade dos padrões.

Tabela 34 - Valores de absorvância obtidos após um processo de digestão realizado a diferentes temperaturas.

Tabela 35 - Efeito das perdas de solvente durante a digestão nos valores de absorvância obtidos.

Tabela 36- Custos dos métodos para determinação de azoto total.

Tabela 37 - Custos dos métodos para determinação de fósforo total.

Tabela 38 - Resumo dos resultados obtidos na validação dos métodos de determinação de Nt (a verde) e de Pt (a laranja).

Tabela 39 – Fórmulas de cálculo da concentração dos três tipos de Alcalinidade.

Tabela 40 - Influência da filtração e da centrifugação na concentração do fósforo total e dos iões de carbonato.

Tabela 41 - Influência da adição de ácido clorídrico na concentração do fósforo total e dos iões de carbonato.

Tabela 42 - Influência da filtração e da centrifugação nos níveis de CQO.

Tabela 43- Influência do carvão ativado nos níveis de Nt e CQO.

Tabela 44- Influência do processo de oxidação ao ar nos níveis de CQO.